



TITLE:

神経軸索形態調節を担うR-Rasの活性制御メカニズムに関する研究(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

梅田, 健太郎

CITATION:

梅田, 健太郎. 神経軸索形態調節を担うR-Rasの活性制御メカニズムに関する研究. 京都大学, 2019, 博士(薬科学)

ISSUE DATE:

2019-03-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21710>

RIGHT:

京都大学	博 士（ 薬科学 ）	氏 名	梅田 健太郎
論文題目	神経軸索形態調節を担うR-Rasの活性制御メカニズムに関する研究		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>記憶や学習といった人間の高度脳機能の基盤は、個々の神経細胞の形態が適切に制御され、精密かつ機能的に構築される巨大な神経回路である。R-Rasは低分子量Gタンパク質の一つであり、神経細胞の軸索に局在して伸長や分枝形成、ガイダンスといった軸索の形態調節に重要な役割を担うことがわかっている。申請者の所属する研究室では、GTPが結合した活性型R-Rasがその特異的な下流エフェクター分子を介して細胞骨格系を再構築し、軸索の適切な形態調節を引き起こすことを明らかにしてきた。R-RasはPI3K（Phosphatidylinositol 3-kinase）シグナルを介してコラプシン反応介在タンパク質2（collapsin response mediator protein-2: CRMP-2）を活性化し、微小管骨格の重合を制御する。また、F-actin（filamentous-actin）結合タンパク質であるafadinを細胞膜へ運び、その場でアクチン骨格の再構築を促すことで軸索の分枝形成を制御することもわかってきた。このようにR-Rasの下流シグナル伝達経路は理解が進んでいる一方、神経細胞におけるR-Rasの活性を制御する上流シグナルの分子メカニズムはあまり明らかになっていない。</p> <p>本研究では、R-Rasの活性化を引き起こす細胞外分子として、神経栄養因子の一つである脳由来神経栄養因子（brain-derived neurotrophic factor: BDNF）に着目した。BDNFは受容体型チロシンキナーゼであるTrkB受容体に結合して細胞内へシグナルを伝え、軸索の成長を促進することが報告されている。そこでまず、初代培養神経細胞に対してBDNF刺激を行い、プルダウンアッセイによりR-Rasの活性を測定したところ、R-Rasの有意な活性上昇と軸索の成長促進が観察された。また、BDNFによる軸索成長の促進効果は、内在性のR-Rasの発現をノックダウンした神経細胞では見られなかった。次に、細胞外からのBDNF刺激と細胞内でのR-Ras活性化をつなぐ分子として、R-Rasに対するGEF（guanine nucleotide exchange factor）であるRasGRF1に着目した。そこで、内在性のRasGRF1の発現をノックダウンした神経細胞に対してBDNF刺激を行い、軸索の形態を観察したところ、BDNFによる軸索成長の促進効果は見られなかった。さらに、RasGRF1を過剰発現した神経細胞では、BDNF非刺激の状態でも軸索の成長が大きく促進された。RasGRF1は、細胞外からの様々な刺激を受けてPKA（protein kinase A）によりSer916/898がリン酸化されると、自身の持つGEF活性が高まり、Rasタンパク質を最大限に活性化することが報告されている。そこで、BDNF刺激時における内在性RasGRF1のSer916/898リン酸化状態を調べたところ、BDNF刺</p>			

激によってこのリン酸化が顕著に促進されることがわかった。さらに、このBDNFによるリン酸化の促進は、Trk受容体の阻害剤やPKAの阻害剤によって抑制されることを確認した。また、BDNF刺激後の細胞内でのcAMP (cyclic AMP) 濃度は有意な差は見られないものの、上昇傾向であることもわかった。

本研究により申請者は、神経細胞におけるR-Ras活性化の分子メカニズムの一端として、BDNFがR-Rasの活性化を引き起こす細胞外因子として働き、このシグナルを受けて細胞内ではRasGRF1がR-Rasの直接の活性化を引き起こし、R-Rasを介した軸索の形態調節を制御していることを明らかにした。

(論文審査の結果の要旨)

本研究は、Rasファミリー低分子量G蛋白質になかで、非常によく研究され、その分子機構の解明が進んでいるclassical R-Rasサブファミリーに対し、その機能に不明な点が多いR-Rasサブファミリー (R-Ras、M-Ras、TC21) のメンバーの中で、代表的なメンバーであるR-Rasの神経軸索伸長や神経回路維持に関わる情報伝達機構を明らかにし、神経回路形成における重要なステップである神経軸索形成に関わる分子機構の1つを解明した研究である。

神経軸索は、様々なガイダンス分子によってその伸長が制御されている。軸索反発を引き起こす反発性軸索ガイダンス分子であるsemaphorinは、その受容体であるplexinがR-Rasに対するGAP活性を分子内にビルトインしており、R-Rasに対しGAP活性を示してR-Rasの活性を不活化して神経軸索を退縮すること、また、別の反発性軸索ガイダンス分子、ephrinもR-Rasの活性を抑制することにより、軸索反発作用を発揮することが分かっており、反発作用におけるR-Rasの役割が明らかにされた。一方、神経軸索を伸長するBDNFなどの分子による軸索伸長促進作用におけるR-Rasの関与については、あまりよく分かっていない。軸索伸長におけるR-Rasの機能について、R-Rasの下流の情報伝達経路についてはよく研究されており、エフェクターであるPI3キナーゼの活性化やafadinを介してインテグリンの活性化や、アクチン骨格や微小管など細胞骨格の再構築により、神経軸索の伸長を促進することが明らかにされている。一方、R-Rasの上流でR-Rasの活性を制御する情報伝達経路はほとんど不明であった。

本研究は、神経軸索の代表的な伸長分子であるBDNFによる軸索伸長作用において、BDNFがR-Rasの活性化分子、RasGRF1をAキナーゼでリン酸化し、活性化することにより、R-Rasを活性化して神経軸索の伸長を促進することを見出し、複雑な神経軸索形成の分子機構を明らかにした研究であり、神経科学の重要な解明課題である神経回路形成の分子機構の解明に寄与するものであると考えられる。以上の研究成果の意義に加えて本論文は全体を通して内容もよく、論理的かつ一貫性を持って記述されており、学位論文としては特に問題はない。また、申請者は神経科学分野で高い学識と優れた研究能力を有することが分かった。

よって、本論文は博士(薬科学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成31年2月18日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。